

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 225—230, Mai 1970

Testosteron-Bestimmung in Plasma und Urin mittels „Competitive Protein Binding Method“

Von A. UETTWILLER

Aus dem Laboratorium (Leiter: Dr. M. Keller) der Universitäts-Frauenklinik Basel (Direktor: Prof. Dr. O. Käser)

(Eingegangen am 28. Oktober 1969)

Es werden zwei Methoden zur Testosteronbestimmung im Plasma bzw. Urin beschrieben, die auf dem Prinzip der kompetitiven Protein-Bindungsmethode beruhen. Bei der Plasma-Bestimmungsmethode wird das proteingebundene Testosteron vom freien Testosteron mittels Sephadex abgetrennt, während bei der Urin-Bestimmungsmethode diese Trennung mittels Florisil erreicht wird. Wir studierten die Plasmabindungskapazität für Testosteron in Abhängigkeit von der Plasma-Verdünnung und den Einfluß der Sephadex- bzw. Florisilmenge auf die Austauschreaktion. Die Zuverlässigkeitskriterien werden angegeben.

Die Untersuchungen von Plasma bei 15 Frauen (20—30jährig) ergaben Testosteron Werte von 20—100 ng in 100 ml.

Die Urin-Ausscheidungswerte von 20 Frauen (20—30jährig) lagen zwischen 2,0 und 28 µg/24 Std.-Urin.

Determination of testosterone in plasma and urine by the competitive protein binding method

Methods are described for the determination of testosterone in plasma and urine, based on the principle of the competitive protein binding method. For plasma, the protein bound testosterone is separated from free testosterone with Sephadex, while Florisil is used for this separation with urine. The plasma binding capacity of testosterone was studied in relation to the plasma dilution; the influence of quantity of Sephadex or Florisil on the exchange reaction was studied. The criteria for reliability are reported.

Studies on the plasma of 15 women (20—30 years) gave testosterone values of 20—100 ng/100 ml.

The urinary excretion values for 20 women (20—30 years) lay between 2.0 and 28 µg/24 hr.

Die quantitative Bestimmung von Hormonmengen im Nanogrammbereich mit Hilfe der Doppel-isotopen-verdünnungsmethoden ist bekanntlich sehr zeitaufwendig und relativ kompliziert.

Die Anwesenheit von Testosteron bindenden Proteinen von hoher Affinität und Bindungskapazität im Plasma gravider Frauen veranlaßte verschiedene Autoren (1—7) zur Ausarbeitung von kompetitiven Verdrängungsmethoden, welche relativ einfach und zeitsparend sind und nur kleine Ausgangsvolumina biologischer Flüssigkeiten benötigen.

Die Interpretation von Testosteronausscheidungswerten im Urin kann durch verschiedene Faktoren wie Nieren-, Leber-, Herzfunktion und Wasserhaushalt erschwert werden. Es empfiehlt sich deshalb zusätzlich die Testosteronbestimmung im Plasma.

Prinzip

1. Inkubation: (Raumtemperatur)
 $^3\text{H-T} + \text{Protein} \rightleftharpoons ^3\text{H-T-Protein} + ^3\text{H-T} + \text{Protein}$

2. Austausch:
 $^3\text{H-T-Protein} + \text{T}^0 \rightleftharpoons \text{T}^0\text{-Protein} + ^3\text{H-T-T}^0\text{-Protein} + ^3\text{H-T-Protein} + ^3\text{H-T}$

Die Auftrennung der tritiierten Protein-Verbindungen (gebundenes Testosteron) vom ^3H -Testosteron (freies tritiiertes Testosteron) wird allgemein nach fünf Verfahren durchgeführt: Dialyse, Sephadex, Florisil, Dextran-Aktivkohle und Ultrafiltration.

¹⁾ $^3\text{H-T}$ = tritiiertes Testosteron, T^0 = unmarkiertes Testosteron.

In der vorliegenden Arbeit beschränkten wir uns auf die Trennung mit Hilfe von Sephadex (Plasmatestosteron) und Florisil (Urintestosteron). Diese beiden Trennmethode erwiesen sich in unseren Händen als die technisch einfachsten und zeitsparendsten.

Das sich einstellende Verhältnis von ^3H -Testosteron zum Plasmaproteingebundenen ^3H -Testosteron ist von großer praktischer Bedeutung. Wir untersuchten deshalb die Abhängigkeit dieses Verhältnisses von der Plasmaverdünnung und studierten die Trennleistung von Sephadex und Florisil.

Sephadex/Puffer

Wir bereiteten eine Sephadexsäule (1g Sephadex G-25 fine) in 0,125 M Phosphatpuffer pH = 7,4. Inkubationslösung (1 ml) wird auf die Säule gebracht und mit der Pufferlösung eluiert. Die Trennung von ^3H -Testosteron-Protein vom ^3H -Testosteron ist ersichtlich aus dem Erscheinen von zwei scharf abgetrennten „peaks“ (Fig. 1a). Gleichzeitig studierten wir durch Erstellung einer Konzentrationsreihe von 0 bis 5% Plasma-Puffer-Verdünnung (die ^3H -Testosteron-Konzentration wurde dabei konstant gehalten) die Plasmabindungskapazität in % für Testosteron in Abhängigkeit der Plasmaverdünnung. Das Resultat ist aus Abbildung 1b ersichtlich. Die Abflachung der Kurve bei 5% Plasmaverdünnung deutet auf eine Sättigung der Bindungskapazität hin. Die Austauschfähigkeit wird daher bei zu hohen Proteinkonzentrationen stark vermindert (Abb. 2).

Die Säule-Gel-Eluierung ist bei großer Bestimmungszahl aus verständlichen Gründen umständlich und

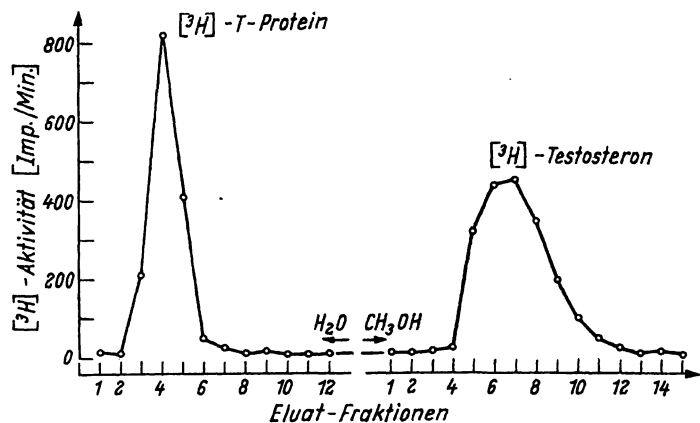


Abb. 4a

Trennung von $[^3\text{H}]$ -Testosteron von $[^3\text{H}]$ -Testosteron-Protein.
Säule: \varnothing 8 mm, 1 g Florisil in H_2O pH = 6,5, 1 ml Inkubationslösung.
Die freie Testosteron-Fraktion wird mit Methanol eluiert

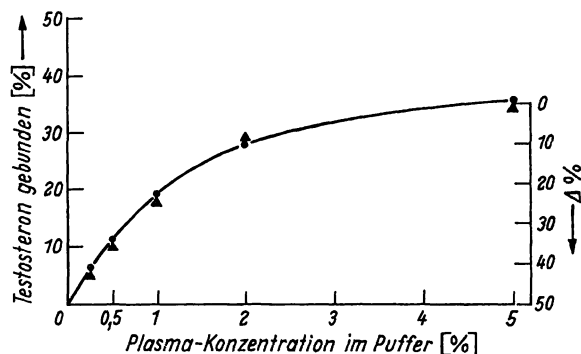


Abb. 4b

Abhängigkeit der prozentualen Bindung von der Plasma-Verdünnung.
-- Florisilsäule. ▲ - Schüttelmethode

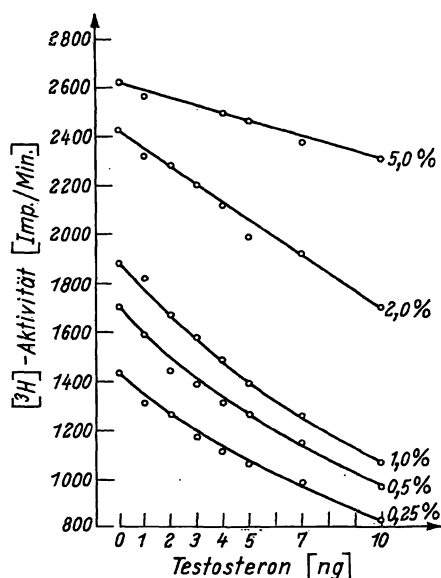


Abb. 5

Einfluß der Plasma-Verdünnung auf die Standardkurven (Florisil-Methode).
Deutlich erkennbar ist das geringere Austauschvermögen mit zunehmender Proteinkonzentration

Abhängigkeit der Plasmaverdünnung (Abb. 4b, Plasma-Wasserverdünnungen von 0 bis 5%). Auffallend ist der deutlich weniger steile Verlauf der prozentualen Bindungskurve (Abb. 4b). Diese Tatsache bewirkt eine geringere Empfindlichkeit der Austauschreaktion (Abb. 5).

Ein weiterer grundsätzlicher Unterschied gegenüber der Sephadexmethode besteht in einer feststellbaren Abhängigkeit der prozentualen Bindung von Hormon an Protein von der Florisilmenge (Abb. 3). Aus diesem Grunde erwies es sich als notwendig, kleine Mengen (40–80 mg) Florisil zu verwenden.

Material

Lösungsmittel

Äther, Methylenchlorid, Methanol, Äthanol, Dioxan, Äthylacetat, Benzol, Petroläther, Chloroform, Aceton spektralrein (Uvasol, Merck). Wasser: bidestilliert (pH = 6,5).

Phosphat-Puffer

KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ; 0,125M, pH = 7,4.

Sephadex

G-25 fine (Pharmacia). 200 mg in 1 ml Phosphatpuffer/Bestimmung (über Nacht quellen lassen).

Florisil

60–100 mesh (Bender & Hobein).

Testosteron- $[1,2\text{-}^3\text{H}]$ ($[^3\text{H}]$ -Testosteron) spezifische Aktivität 153 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ (Amersham).

Dünnschichtchromatographische Reinigung.

Fließmittel: Chloroform/Aceton 80:20 (v/v).

$[^{14}\text{C}]$ -Testosteron

Spezifische Aktivität 191 $\mu\text{C}/\text{mg}$. Verwendet für Wiedergewinnungsversuche.

Testosteron

Unmarkiertes Testosteron, dessen Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie überprüft wurde.

Epitestosteron

Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Plasma

Schwangerenplasma (33.–36. Schwangerschaftswoche). Die Schwangeren wurden zuvor mit Primosiston (Schering AG, Berlin) behandelt. Das heparinisierte Blut wird sofort zentrifugiert und das Plasma in 1,2 ml Portionen in sterilen Kunststoffröhrchen bei -20° eingefroren.

Plasmaverdünnung

Zur *Urin*-Testosteron-Bestimmung: 0,5% (v/v) in bidest. Wasser (pH = 6,5), enthaltend 0,067 ng Testosteron- $[1,2\text{-}^3\text{H}]/\text{ml}$.

Zur *Plasma*-Testosteron-Bestimmung: 1% (v/v) in Phosphatpuffer (pH = 7,4), enthaltend 0,134 ng Testosteron- $[1,2\text{-}^3\text{H}]/\text{ml}$.

Radioaktive Messungen

Die Flüssigkeits-Scintillationsmessungen werden mit dem Mark I (Nuclear-Chicago) durchgeführt. Die wäßr. Proben werden zu 10 ml Dioxanlösung, enthaltend 1 g Naphthalin und 50 mg 5-2 Diphényloxazol, gegeben. Meßzeit: 10 Min.

Glaswaren

Gereinigt mit Chromschwefelsäure, Wasser, bidest. Wasser und Methanol.

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel MN-GHR-UV₂₅₄, Alox MN-G-UV₂₅₄.

Die Adsorbens werden mit Methanol und Äther gewaschen und anschließend getrocknet.

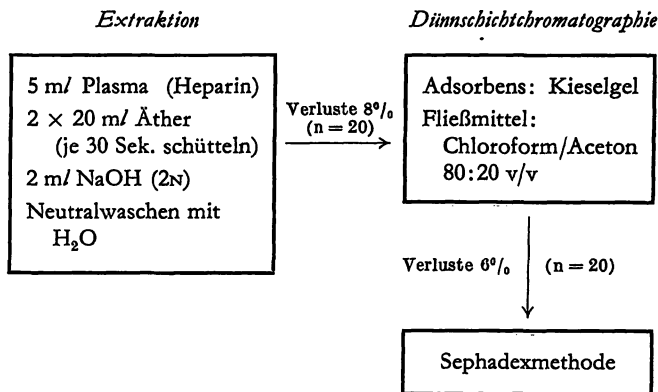
Watte

Waschen mit verdünnter HCl (1N), Wasser, Methanol und Chloroform.

Methodik

Plasma-Testosteron-Methode

Aufarbeitungsschema



Jede Analyse wird im Doppel ausgeführt. Die Ätherphase wird am Vakuumrotationsverdampfer (30°) eingengt. Der getrocknete Rückstand wird in Petroläther (5 ml) portionenweise gelöst und in ein Spitzentrifugenglas überführt. Nach Eindampfen und Trocknen bei 40° am Vakuum (Trockenschrank, Exsikkator) wird der Rückstand in 60 µl Methanol gelöst und davon 2 × 20 µl auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. (Die Dünnschichtplatte wird dabei auf einer elektrisch geheizten Kupferplatte auf 50° erwärmt.) Zur Lokalisation im UV-Licht werden je 1 µg Testosteron links und rechts der Analyse aufgetragen. Die lokalisierte Analysenzone wird sorgfältig ausgekratzt und mit 3 ml Methanol bei 70° eine Minute lang eluiert (der Eluierungsverlust beträgt 6–8%).

Meßtechnik

a) Standardkurve

Auf eine Einzelplatte werden im Doppel je 0,5; 1; 2; 3 ng Testosteron aufgetragen. Nach Entwicklung des Chromatogramms werden die entsprechenden Flächen ausgekratzt und mit Methanol eluiert (s. o.). Das Lösungsmittel wird abgedampft. Die getrockneten Rückstände werden mit je 5 ml Petroläther in die Inkubationsgläser überführt. Nach Abdampfen des Petroläthers und Trocknen am Vakuum werden je 1 ml 1 proz. Plasma-Pufferlösung zugegeben.

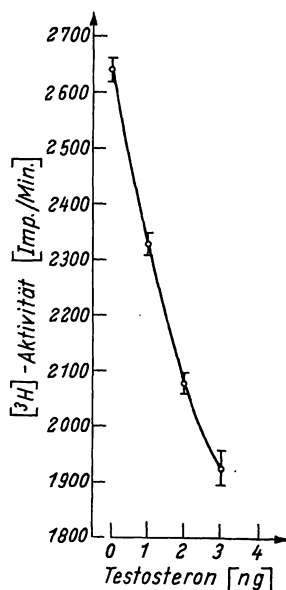


Abb. 6

Standardkurve (Sephadex-Methode).
Plasma-Verdünnung 1%. Mittelwertkurve aus 12 Standardkurven

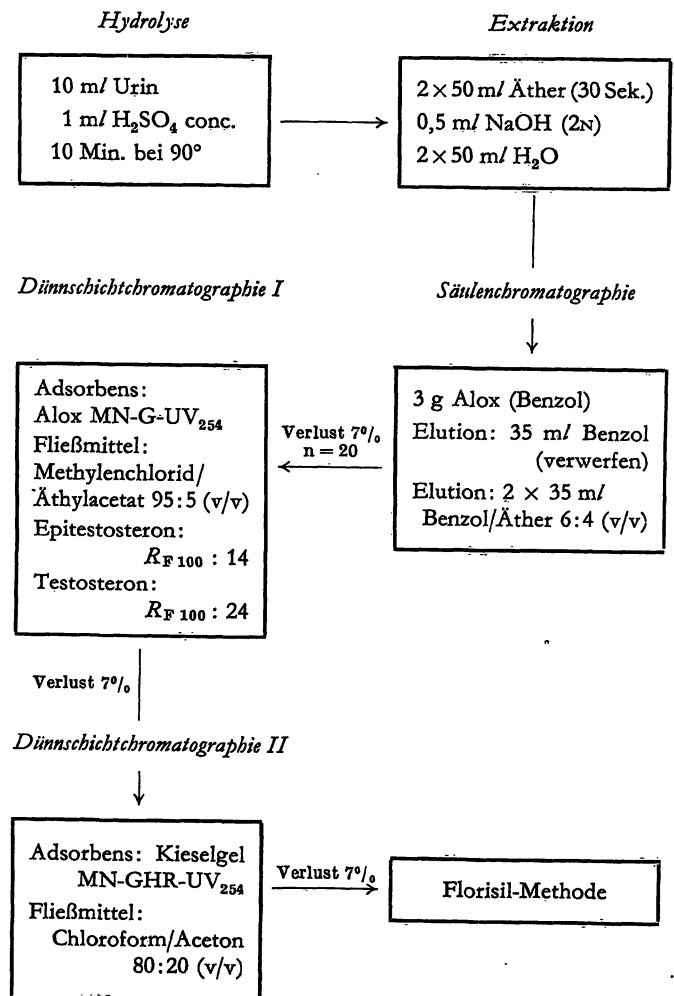
Nach kurzem Schütteln wird 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. 800 µl dieser Inkubationslösung werden dann zu den vorbereiteten Sephadex-Puffer-Röhrchen (200 mg Sephadex/1 ml Puffer) gegeben. Man mischt anschließend die gut verschlossenen Röhrchen 1 Min. lang mechanisch. Nach Zentrifugation (2 Min.) werden von der überstehenden Flüssigkeit 700 µl abpipettiert und zu 10 ml Scintillationslösung gegeben. Die Meßlösung wird vor der Messung eine Stunde lang bei -4° stehengelassen. Meßzeit: 10 Min. Die gemittelten Imp./Min. werden zur Erstellung der Standardkurve verwendet (Abb. 6).

b) Analysen

Die vereinigten Eluate der Analysenproben werden eingedampft, in 5 ml Petroläther wieder gelöst und in die Inkubationsgläser überführt. Die Weiterbearbeitung erfolgt genau gleich wie für die Standard-Vorschrift. Die zu bestimmenden ng Testosteronwerte können direkt auf der Standardkurve abgelesen werden. Man korrigiert die gefundenen Werte unter Berücksichtigung des Nullwerts und der Analysenverluste und rechnet auf 100 ml Plasma um.

Urin-Testosteron-Methode

Aufarbeitungsschema:



Jede Analyse wird im Doppel ausgeführt. Man extrahiert den hydrolysierten Urin durch Schütteln mit 2 × 50 ml Äther (je 30 Sek.). Nach Waschen der Ätherphase mit NaOH und Wasser wird der Äther abgedampft und der getrocknete Rückstand in Benzol gelöst und auf die Alox-Säule gegeben. Die Eluate (Benzol-Äther-Fraktion) werden am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und der Rückstand am Vakuum getrocknet.

Dünnschichtchromatographie I

Der Rückstand wird in 100 μ l Methanol aufgenommen und davon 2 \times 20 μ l auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Testosteron-Zonen werden ausgekratzt und mit Methanol wie oben beschrieben eluiert, das Lösungsmittel abgedampft und die vereinigten Rückstände am Vakuum getrocknet.

Dünnschichtchromatographie II

Der Rückstand der I. Dünnschichtchromatographie wird in 60 μ l Methanol aufgenommen und davon 10 μ l auf die Platte aufgetragen. Eluierung, Abdampfung und Trocknung wie oben beschrieben.

Meßtechnik

a) Standardkurve

Aus einer Testosteron-Stammlösung (10 mg/ml Äthanol) werden entsprechende Volumina, die 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ng enthalten, in die Inkubationsgläser pipettiert. Nach sorgfältigem Abdampfen des Lösungsmittels am Vakuum werden je 2 ml 0,5proz. Plasmlösung zugegeben und die Gläschen kurz geschüttelt. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde. Dann Zusatz von je 80 mg Florisil in jedes Inkubationsgläschen. Nach mechanischem Mischen (1 Min.) wird 5 Min. stehengelassen. Je 900 μ l der überstehenden Lösung werden zu 10 ml Scintillationslösung gegeben. Messung: Es gelten die gleichen Meßbedingungen, die bei der Sephadex-Methode beschrieben wurden. Aus den aufgetragenen Werten entsteht die Eichkurve (Abb. 7).

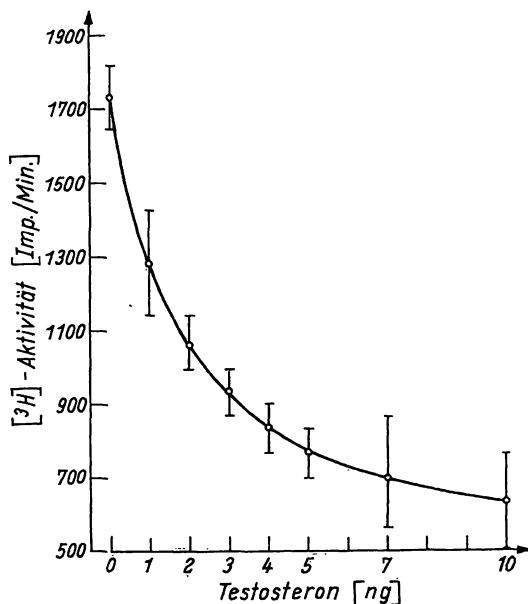


Abb. 7

Standardkurve (Florisil-Methode).

Plasma-Verdünnung 0,5%. Mittelwertkurve aus 10 Standardkurven

b) Analysen

Die Eluate der Dünnschichtchromatographie II werden analog der Plasma-Testosteron-Methode behandelt. Die gefundenen Werte werden unter Berücksichtigung der Nullwerte und der Analysenverluste auf die 24-Stdn.-Urinmenge umgerechnet.

Zuverlässigkeitskriterien der Methoden

Die Wiedergewinnungsversuche werden mit [14 C]-Testosteron (25000 Imp./Min.) ausgeführt. Das markierte Testosteron wurde vorerst dünn-schichtchromatographisch gereinigt.

Richtigkeit der Methoden

Plasma: 86%

Urin: 79%

Tab. 1
Verluste während des Analysengangs

Plasma			Urin		
	% Verluste	n		% Verluste	n
Extraktion	8	20	Hydrolyse,		
Dünnschicht	6	20	Extraktion, Säule	7	20
			Dünnschicht I	7	15
			Dünnschicht II	7	15

Beträchtliche Schwierigkeiten bei diesen hochempfindlichen Methoden bereiten die unspezifischen Nullwerte. Die verschiedenen Ursachen wurden schon von KARO und HORTON (7) beschrieben. Die möglichen Störungen durch Lösungsmittelrückstände schlossen wir durch die strikte Verwendung von spektralreinen Lösungsmitteln aus.

Beim Gebrauch von unbehandeltem Kieselgel bzw. Alox erhielten wir bei der Extraktion von 5 ml dest. H₂O Nullwerte von 1,8 bis 2,3 ng/Probe. Unter Verwendung von mit Methanol und Äther gewaschenen Adsorbens erhielten wir Werte von 1,0 bis 1,3 ng/Probe. Wirklich annehmbare Nullwerte von 0,2 bis 0,5 ng/Probe erhielten wir erst, als auch die Standards unter genau denselben Bedingungen (Dünnschicht-Eluierung) behandelt wurden.

Zusatzversuche

Bei Zusatz von 3 ng reinem Testosteron zu 5 ml dest. H₂O (n = 10) erhielten wir unter Berücksichtigung der Nullwert- und Verlust-Korrektur Werte von 2,7 bis 3,5 ng. Die Abweichung vom zugegebenen Wert beträgt 10–14%. Diese prozentualen Abweichungen sind mit dem gefundenen Variationskoeffizienten der Methode vergleichbar.

Präzision der Methoden

Pool-Plasma: n = 25; \bar{X} = 67,5 \pm 8,2 ng; VK = 12%Urin: n = 12; \bar{X} = 5,3 \pm 0,45 μ g; VK = 8,5%

Empfindlichkeit der Methoden

Plasma: Unter den beschriebenen Meßbedingungen können noch 11,3 ng Testosteron in 100 ml Plasma bestimmt werden.

Urin: Die noch bestimmbare Urin-Testosteron Menge beträgt 4,2 μ g in 1000 ml Urin.

Die Empfindlichkeit konnte unter Verwendung von Albuminfreiem Plasma (Fraktionierung mit Rivanol) bei den von uns verwendeten Plasma-Verdünnungen nur unwesentlich gesteigert werden.

Spezifität der Methoden

Die Spezifität der Methoden ist ausgezeichnet. Versuche ergaben, daß eine zusätzliche Papierchromatographie zur weiteren Reinigung der Plasmaextrakte

überflüssig ist. Die Urinextrakte hingegen mußten einer viel intensiveren Vorreinigung unterworfen werden. Es wurde deshalb zusätzlich eine Säulenchromatographie angewendet. Die Möglichkeit einer Verdrängung von $[^3\text{H}]$ -Testosteron aus dem Protein-Komplex durch andere anwesende Steroide wurde am Beispiel des Epitestosterons studiert. Mit Epitestosteronmengen

zwischen 0,5 und 10 ng stellten wir keine Verdrängungseffekte fest, welche die unspezifischen Nullwerte überstiegen.

Zeitaufwand der Methoden

Plasma-Testosteron: 5 Doppelbestimmungen täglich.

Urin-Testosteron: 4•Doppelbestimmungen täglich.

Literatur

1. SLAUNWHITE, W. R. und A. A. SANDBERG, J. Clin. Invest. 38, 384 (1959). — 2. PEARLMAN, W. H., O. CRÉPY und M. MURPHY, J. Clin. Endocr., Springfield 27, 1012 (1967). — 3. PEARLMAN, W. H. und O. CRÉPY, J. biol. Chemistry 242, 182 (1967). — 4. VERMEULEN, A. und L. VERDONCK, Steroids 11, 609 (1968). —
5. MAGUELONE, G. F., M. A. RIVAROLA und C. J. MIGEON, Steroids 12, 323 (1968). — 6. HALLBERG, M. C., E. M. ZORN und R. G. WIELAND, Steroids 12, 241 (1968). — 7. KATO, T. und R. HORTON, Steroids 12, 634 (1968).

Dr. A. Uettwiller
Schanzenstr. 46
CH 4056 Basel